

С.С. ОСОЧУК

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ ЛПВП В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ РАЗВИТИЯ ПЕРИТОНИТА

Витебский государственный
медицинский университет, Беларусь

Длительное время ЛПВП рассматривались лишь как антиатерогенные липопротеины. Однако их функциональная активность выходит за рамки общепринятых представлений. Настоящая работа посвящена изменениям структуры и функциональной активности ЛПВП при экспериментальном перитоните. Наибольшие изменения отмечаются через 4 и 7 часов после инициации перитонита и заключаются в усилении функциональной активности ЛПВП (активация обратного транспорта холестерина и транспорта жирных кислот, обладающих противовоспалительной активностью). В поздние сроки отмечается восстановление активности и структуры ЛПВП. Делается вывод о возможном ограничении активности воспалительного процесса с участием ЛПВП в ранние сроки экспериментального перитонита.

Летальность при распространенном гнойном перитоните колеблется от 13 до 40% [3]. Изучение этиологии и патогенеза перитонита остается актуальным и необходимым.

В течение длительного времени липопротеины высокой плотности (ЛПВП) рассматривались лишь с позиции их антиатерогенного действия. Однако в последнее время накапливается все больше свидетельств полифункциональности ЛПВП, в частности, работ, демонстрирующих участие ЛПВП в регуляции ранних стадий воспалительных процессов [8]. Однако до настоящего времени сведения об изменении состава ЛПВП при воспалительных процессах отрывочны и разноречивы. В настоящей работе изучалась динамика из-

менений структуры ЛПВП в различные сроки экспериментального перитонита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Перитонит моделировали однократным внутрибрюшинным введением 4 млрд. микробных тел *E.Coli* (штамм О-26) шестидесяти белым беспородным крысам-самцам средней массой тела 180 – 200 гр. Контролем служили 12 интактных крыс. Животных декапитировали через 4, 7, 24 и 48 часов после инъекции *E.Coli*. Кровь собирали в цитратные пробирки. Из плазмы выделяли ЛПВП методом химической преципитации апо-В-содержащих липопротеинов под действием гепарина в присутствии ионов марганца [4]. Белок определяли биуретовым методом. Холестерин (Хс) определяли наборами, предоставленными коммерческой фирмой Анализ-Х (Белорусский государственный университет). Липидную фракцию ЛПВП экстрагировали смесью хлороформ: метанол (2:1). Общие фосфолипиды (ОФЛ) ЛПВП определяли после их минерализации по неорганическому фосфату в реакции с молибденовокислым аммонием в присутствии аскорбиновой кислоты. Фосфолипиды разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии [1], собирали в огнеупорные пробирки и минерализовали в хлорной кислоте при температуре 220 – 240°C. Процентное содержание оценивали по неорганическому фосфату [7]. Для определения спектра жирных кислот эфиров холестерина (ЭХС) ЛПВП липидный экстракт разделяли мономерной тонкослойной хроматографией в системе растворителей гексан (73мл): диэтиловый эфир (25 мл): ледяная уксусная кислота (2мл). Фракции ЭХС собирали в вials, метилировали 0,75N серной кислотой в метаноле при температуре 65°C в течение 24 часов. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Экстракт высушивали в токе азота, немедленно растворяли в ацетоне и анализировали на газовом хроматографе Цвет 500М (колонка длиной 2 м, набита реоплекс 400, скорость потока газа-носителя (He) – 30 мл/мин, детектирование пламенно-ионизационным детектором по

стандартам метиловых эфиров. Соотношения детектированных жирных кислот рассчитывали по площади пиков и выражали в процентах. Для исследования активности лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) использовались коммерческие наборы Immunotech Чехия. Принцип метода определения активности ЛХАТ основан на измерении скорости включения ^{14}C -холестерина в состав эфиров холестерина исследуемой плазмы после их выделения методом мономерной тонкослойной хроматографии. Активность фермента выражали в мкмоль образованного эфира холестерина на 1 л плазмы в час. Результаты обрабатывались статистически с помощью компьютерных программ Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 4 часа после введения *E.Coli* в ЛПВП достоверно увеличивалась концентрация холестерина ($p=0,02$) и отношение белок/фосфолипиды ($p=0,002$), при этом достоверно снижалась концентрация общих фосфолипидов (ОФЛ) ($p=0,001$), отношения белок/Хс и ОФЛ/Хс ($p=0,01$ и $0,002$ соответственно) (таблица 1). В структуре фосфолипидов достоверно увеличивалась концентрация лизофосфатидов в сочетании с достоверным снижением количеств их предшественников – фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) ($p<0,0001$, $p=0,0006$ и $0,038$ соответственно) (таблица 2). Концентрация ингибитора ЛХАТ – сфингомиелина (СФ) достоверно снижалась ($p=0,006$). Активность ЛХАТ возрастала ($p=0,0006$). Эстерификация холестерина осуществлялась преимущественно пальмитиновой (C16:0), линолевой (C18:2) и дигомо- γ -линоленовой (C20:3) кислотами ($p=0,028$, $0,061$ и $0,04$ соответственно) (таблица 3). Концентрации миристиновой (C16:0), пентадекановой (C15:0), гептадекановой (C17:0), гептадеценовой (C17:1), стеариновой (C18:0), олеиновой (C18:1) и арахидиновой (C20:4) кислот были снижены или имели тенденцию к понижению ($p=0,0005$, $0,057$, $0,019$, $0,009$, $0,075$, $0,0007$, и $<0,0001$ соответственно).

Учитывая отсутствие у крыс активности эфиров холестерина переносящего белка (ЭХПБ) [2], увеличение активности ЛХАТ, в сочетании с возрастанием количества Хс, может свидетельствовать об усилении обратного транспорта Хс, возможно, с целью усиления продукции желчных кислот в печени и обеспечения синтеза противовоспалительных стероидных гормонов надпочечниками [2]. Изменения жирнокислотного профиля эфиров холестерина (ЭХс) может быть следствием изменения транспорта предшественника эндогенных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – линолевой (C18:2) кислоты, а так же вновь синтезированной дигомо- γ -линоленовой кислоты (C20:3) в печень с целью включения в экспортируемые фосфолипиды и ограничения интенсивности воспалительного процесса, поскольку дигомо- γ -линоленовая кислота способна выступать в качестве конкурента арахидиновой кислоты при синтезе провоспалительных простаноидов, а также способна увеличивать микровязкость [5] мембран при встраивании в фосфолипиды и изменять, таким образом, ее проницаемость и активность мембранных ферментов. Увеличение количества пальмитиновой кислоты, возможно, обусловлено более интенсивным ее использованием в энергетическом обмене. Изменения спектра фосфолипидов являются следствием активации ЛХАТ-реакции (уменьшение количества ФХ, ФЭА и увеличение количества ЛФ), а также следствием создания наиболее благоприятных условий для протекания этой реакции, поскольку СФ является специфическим ингибитором ЛХАТ [6].

Через 7 часов после инициации воспаления, в сравнении с предыдущим сроком исследования, достоверно увеличивалась концентрация ОФЛ ($p=0,005$) (таблица 1). В фосфолипидном спектре, в сравнении с предыдущим сроком исследования, отмечены более существенные изменения. Количества ЛФ и ППФ достоверно снижались ($p=0,0017$ и $0,005$ соответственно), а уровни ФЭА и СФ достоверно увеличивались ($p=0,015$ и $0,0015$ соответственно). В составе ЭХс, в сравнении с предыдущим сроком исследования, (таблица

Таблица 1.

Белково-липидный состав ЛПВП

Интактные	Белок	Хс	ОФЛ	Белок/Хс	ОФЛ/Хс	Белок/ФЛ
	78,68±2,3	1,47±0,05	3,42±0,23	57,32±3,09	2,49±0,22	23,59±1,63
4 часа	76,75±2,8	1,65±0,01 **	2,37±0,04 **	46,09±1,99 **	1,44±0,02 **	31,66±1,21 **
7 часов	74,11±2,93	1,65±0,01 **	2,7±0,09 **(**)	44,63±1,69 **	1,57±0,08 **	27,99±1,66
24 часа	70,24±0,84 **	1,48±0,03 (**)	2,98±0,3	47,45±1,35 **	2,04±0,29	24,9±2,6
48 часов	74,35±1,8 (*)	1,56±0,02 (*)	3,2±0,11	47,28±2,3 **	2,06±0,08	22,68±0,92

Примечание: ** - достоверно, * - тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с интактными животными; (**) достоверно, (*) – тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с предыдущим сроком исследования.

3) достоверно возрастали процентные содержания миристиновой (C14:0) ($p=0,003$), гептадекановой и гептадеценовой (C17:0 и C17:1) ($p=0,02$, $0,007$) и олеиновой (C18:1) ($p=0,012$) кислот, тенденции к увеличению количеств стеариновой (C18:0) и линолевой (C18:2) ($p=0,059$) кислот. Процентное содержание пальмитиновой кислоты (C16:0) достоверно снижалось ($p=0,01$), а дигомо-γ-линоленовой кислоты (C20:3) имело тенденцию к достоверному уменьшению ($p=0,055$). Полученные изменения свидетельствуют об интенсификации процесса возобновления структуры ЛПВП, вероятно, за счет усиления переноса

са фосфолипидов трансферными белками или активации липолитического преобразования триглицеридбогатых ЛП в ЛПВП. Об этом может свидетельствовать увеличение количества ОФЛ, снижение количества ЛФ на фоне неизменно высокой активности ЛХАТ. Изменения спектра жирных кислот ЭХС могли быть обусловлены возникающим дефицитом ПНЖК в условиях их повышенного расходования при активации воспаления. Увеличение олеиновой и линолевой кислот может быть следствием их переноса к печени с целью продукции эндогенных ω^9 ПНЖК.

Через 24 часа после инъекции *E.Coli*,

Таблица 2.

Фосфолипидный состав ЛПВП и активность ЛХАТ

Интактные	Спектр фосфолипидов (%)					Активность ЛХАТ мкМ/л ⁻¹ /ч ⁻¹
	ЛФ	СФ	ФХ	ФЭА	ПГФ	
	33,12±0,87	11,74±0,61	44,22±0,8	6,38±0,37	5,2±0,44	3,77±0,62
4 часа	38,6±0,34 **	9,08±0,57 **	40,03±0,56 **	5,2±0,36 **	7,01±0,87 *	16,88±2,82 **
7 часов	35,3±0,85 *(**)	12,9±0,83 (**)	40,1±0,52 **	7,22±0,27 (**)	3,88±0,26 **(**)	21,9±3,96 **
24 часа	29,31±1,67 **(**)	13,44±0,65 *	45,32±1,01 (**)	6,15±1,09	5,75±0,84 (*)	10,57±3,5 **(*)
48 часов	33,9±1,7	13,89±0,55 **	40,74±2,26 (*)	5,93±0,37	6,34±0,55	8,5±3,5

Примечание: ** - достоверно, * - тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с интактными животными; (**) достоверно, (*) – тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с предыдущим сроком исследования.

Таблица 3.

Спектр жирных кислот эфиров холестерина ЛПВП

	Контроль	4 часа	7 часов	24 часа	48 часов
14:0	15,4±1,41	1,25±0,11 **	27,07±2,3 **(**)	29,4±3,58 **	3,26±0,39 **(**)
15:0	1,04±0,28	0,38±0,1 *	0,38±0,1 *	Следы	Следы
16:0	50,04±3,0	66,29±3,7 **	44,46±2,97 (**)	56,03±1,61 (**)	79,37±2,27 **(**)
17:0	0,82±0,17	0,15±0,03 **	0,68±0,15 (**)	3,78±0,69 **(**)	0,16±0,03 **(**)
17:1	0,73±0,11	0,19±0,03 **	0,78±0,11 (**)	Следы	13,01±2,34 **(**)
18:0	5,6±0,85	3,27±0,48 *	5,49±0,86 (*)	10,68±1,29 **(**)	3,14±2,34 (**)
18:1	8,29±0,61	2,35±0,18 **	5,95±0,4 **(**)	Следы	Следы
18:2	0,66±0,13	1,47±0,28 *	3,43±0,69 **(*)	Следы	0,72±0,12 (**)
20:3	0,01±0,026	24,6±4,3 **	11,73±1,98 **(*)	0,04±0,009 **(**)	0,3±0,06 **(**)
20:4	17,3±2,31	Следы	Следы	0,02±0,004 **(**)	Следы

Примечание: ** - достоверно, * - тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с интактными животными; (**) достоверно, (*) – тенденция к достоверным изменениям, в сравнении с предыдущим сроком исследования.

в сравнении с предыдущим сроком исследования, уровень холестерина достоверно снижался ($p=0,002$) (таблица 1). В фосфолипидном спектре (таблица 2) содержание ЛФ достоверно снижалось ($p=0,006$), количество ФХ – увеличивалось ($p=0,0004$), а ПГФ демонстрировало тенденцию к увеличению ($p=0,052$). Активность ЛХАТ демонстрировала тенденцию к снижению, в сравнении с предыдущим сроком исследования ($p=0,09$), оставаясь достоверно выше интактных животных ($p=0,04$). Спектр жирных кислот ЭХС претерпевал более значительные изменения (таблица 3). Происходило достоверное увеличение количества пальмитиновой (C16:0) ($p=0,02$) и гептадекановой (C17:0) ($p=0,012$) и стеариновой (C18:0) ($p=0,02$) кислот. Олеиновая (C18:1) и линолевая (C18:2) кислоты обнаруживались лишь в следовых количествах, количество дигомо-γ-линоленовой кислоты

(C20:3) значительно снижалось ($p=0,004$) и появлялось незначительное количество арахидоновой (C20:4) кислоты. Снижение количества холестерина может быть обусловлено тенденцией к понижению активности ЛХАТ, вызванной увеличением количества СФ на предыдущем сроке исследования. Снижение активности фермента повлекло за собой увеличение количества ФХ и снижение количества ЛФ. Последние изменения могут также быть обусловлены снижением активности ассоциированной с ЛПВП фосфолипазы A₂. Изменения жирнокислотного спектра ЭХС, вероятнее всего, отражают снижение интенсивности продукции эндогенных полиненасыщенных жирных кислот ω⁹ ряда.

Через 48 часов после инъекции *E. Coli* в белково-липидном спектре отмечается возврат показателей к значениям интактных животных (таблица 1) за исключением

белково-холестеринового коэффициента, значение которого было достоверно ниже интактных животных ($p=0,02$). В фосфолипидном спектре, в сравнении с предыдущим сроком исследования, отмечалась лишь тенденция к снижению количества ФХ, при этом количество СФ оставалось достоверно более высоким в сравнении с интактными животными ($p=0,02$). В спектре жирных кислот ЭХС продолжали нарастать тенденции к увеличению количества насыщенных жирных кислот. Достоверно (на 41%) увеличивалось содержание пальмитиновой (C16:0) ($p=0,001$) кислоты, содержание миристиновой (C14:0), гептадекановой (C17:0), стеариновой (C18:0) кислот снижалось ($p=0,001, 0,006, 0,004$ соответственно). Значительно увеличивалось количество гептадеценной (C17:1) ($p<0,0001$) кислоты и несколько возрастали количества линолевой (C18:2) и дигомо-γ-линоленовой (C20:3) кислот ($p<0,0001$ и $p=0,01$ соответственно). Изменения белково-липидного спектра на данном сроке исследования, вероятно, отражают процесс восстановления исходной структуры ЛПВП, значительно модифицированной на ранних стадиях воспалительного процесса. Увеличение количества насыщенных кислот в сочетании с возрастанием дигомо-γ-линоленовой (C20:3) кислоты может отражать вновь возникающий дефицит ПНЖК и, возможно, активацию эндогенных заместителей ПНЖК – жирных кислот ω^9 ряда.

Таким образом, в динамике изменений структуры ЛПВП наибольшие сдвиги отмечаются через 4 и 7 часов после инициации воспалительного процесса. На этой стадии изменения, вероятно, способствуют ограничению активности воспалительного

процесса. В последующие сроки структура ЛПВП приближается к исходным значениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кейтс М. Техника липидологии. Москва.: "Мир," 1975. 358с.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г.. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. – С.-Петербург, 1995.
3. Косинец А.Н. Профилактика и лечение гнойно-воспалительных осложнений при экстренных операциях на органах брюшной полости (клинико.-экспериментальное исследование): Дисс. на соискание ученой степени доктора мед. наук. – Витебск, 1994.
4. Современные методы исследования липопротеинов высокой плотности (методические рекомендации) /Под ред. Н.В.Перовой М.: -1983.175с.
5. Титов В.Н. Клиническая биохимия и кардинальные вопросы патогенеза атеросклероза // Клин. лаб. диагностика 2000. №1. стр.3 – 9.
6. Jonas A. Lecitin cholesterol acyltransferase //Biochim. et Biophys. Acta 2000. Vol.1529. P.245-256.
7. Vaskowsky V.E. et al. A universal reagent for fosfolipids analisis //J.Chromatogr. 1975. Vol.114, P.129-141.
8. Vosbek K., Tobias P., Mueller H. Et al. Priming of polymorphnonuclear granulocytes by lipopolysacharides and its complexes with lipopolysacharide binding protein and high density lipoprotein. //J.Leucoc. Biol. 1990 Feb.,47(2), P.97-104

Поступила 03.01.2005 г.